

AUS DEM THEODOR KOCHER-INSTITUT DER UNIVERSITÄT BERN
ABTEILUNG FÜR GEWEBEKULTUR (PROF. DR. E. HINTZSCHE)

Das Kernvolumen in vitro gezüchteter Leberzellen

INAUGURALDISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE DER MEDIZINISCHEN
FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

VORGELEGT VON

JEHUDAH LEURER

VON JERUSALEM

Genehmigt auf Antrag von Professor Töndury

JERUSALEM 1953

AUS DEM THEODOR KOCHER-INSTITUT DER UNIVERSITÄT BERN
ABTEILUNG FÜR GEWEBEKULTUR (PROF. DR. E. HINTZSCHE)

Das Kernvolumen in vitro gezüchteter Leberzellen

INAUGURALDISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE DER MEDIZINISCHEN
FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

VORGELEGT VON

JEHUDAH LEURER

VON JERUSALEM

Genehmigt auf Antrag von Professor Töndury

JERUSALEM 1953



PRINTED IN ISRAEL
HADASSAH APPRENTICE SCHOOL OF PRINTING, JERUSALEM

Das Kernvolumen in vitro gezüchteter Leberzellen*

A. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Anschauungen über die Bedeutung der Variation der Kernvolumina haben sich im Laufe der Zeit wesentlich erweitert. G. Hertwig bezog 1913 die Unterschiede in der Kerngrösse ausschliesslich auf Differenzen in der Chromosomenzahl; Kerne mit haploidem Chromosomensatz würden danach nur halb so grosses Volumen bzw. Oberfläche aufweisen wie die diploider Zellen der gleichen Gewebsart. Auch Jacobj stand 1923 - bei Beginn seiner karyometrischen Untersuchungen - zunächst noch unter dem Eindruck relativer Konstanz der Kerngrösse. Bald aber verband er schon funktionelle Gesichtspunkte mit den morphologischen, indem er z. B. erkannte, dass im Leberläppchen eine direkte Abhängigkeit zwischen der Kerngrössenverteilung und der Anordnung der Blutgefässe besteht (Jacobj, 1925). Funktionsbedingte Änderungen der Kerngrösse haben sich seither in Geweben verschiedenster Art nachweisen lassen, so im Darmepithel (Hintzsche & Tanner, 1937), in Kernen der Follikelepithelien und der Granulosa-Lutein-Zellen (Hintzsche, 1945) und im Schmelzorgan (Brügger, 1949), um nur einige Beispiele aus den Untersuchungen der Berner Schule anzuführen. Sie ermöglichten schliesslich Hintzsche (1949), die Karyometrie zu einer biologischen Untersuchungsmethode auszubauen, indem es ihm gelang, die Auf- und Abbauvorgänge im menstruellen Cyklus damit quantitativ zu erfassen. Schon bei diesen Beobachtungen wurde aber klar, dass die Kerngrössenänderungen durchaus nicht immer auf Zu- oder

* Herrn Prof. Hintzsche möchte ich für Überlassung des Themas und seine mir erwiesene Hilfe danken.

Abnahme des chromatischen Apparates zurückgeführt werden können. Tatsächlich sind denn auch besonders von der Marburger Schule unter Leitung von Benninghoff eine Reihe von Befunden publiziert worden, die vorübergehende Änderungen des Kernvolumens unter Wirkung exogener oder endogener Faktoren erkennen lassen und die treffend als Kernschwellung bzw. Kernschrumpfung bezeichnet worden sind. In diese Gruppe gehören z. B. die Untersuchungen von H. Krantz (1947) über den Einfluss von Narcotica auf die Kerngrösse, ferner die von A. Puff (1951) über Lichtwirkung auf die Netzhaut und die von H. Simmenroth (1951) über die Folgen chronischer Reizung des Plattenepithels.

Aus dieser kurzen Einleitung geht hervor, welche erhebliche biologische Bedeutung die Karyometrie gewonnen hat und in welchen Hauptrichtungen die Studien zur Zeit betrieben werden. Nichts lag näher als der Versuch, auch Kulturen in vitro gezüchteter Gewebe für derartige Forschungen heranzuziehen; im Gegensatz zu den gewöhnlichen Schnittpräparaten, die nur ein momentanes Zustandsbild bieten, würden sie ja - insbesondere unter Zuhilfenahme des Mikrofilmes - die Möglichkeit bieten, die Vorgänge am Kern laufend zu beobachten. So ist es nicht verwunderlich, dass C. Dogliotti schon 1927 versuchte, Kern- und Zellgrössen in Kulturen verschiedener Gewebsarten zu messen. Er bestimmte planimetrisch die Zell- und Kernflächen, wie sie sich in einer Aufsicht auf die Kultur darstellen, mit dem Ziel, die Kern-Plasma-Relation zu ermitteln. Dabei war sich Dogliotti bewusst, dass die Zellen in der Kultur stark abgeplattet werden; trotzdem glaubte er die dritte Dimension vernachlässigen zu können - für seine Untersuchungen vielleicht zu Recht - denn er durfte annehmen, dass Kern und Plasma im gleichen Mass abgeflacht werden. Immerhin hat Dogliotti bereits die Frage der verschieden starken Abplattung in verschiedenen Regionen der Kultur erörtert, und auch versucht, Querschnitte durch Kulturen ergänzend beizuziehen. Er hielt indessen die durch die Einbettungs- und Schneidetechnik entstehenden Fehlermöglichkeiten für zu gross, um genaue Messungen durchzuführen.

1932 erschienen die ersten Arbeiten von Wermel und Ignatjewa. Ihre Untersuchungen erstreckten sich auf Vergleiche der Zellkern-

größen an embryonalem, erwachsenem und in vitro gezüchtetem Gewebe. Die von ihnen angewandte Methode war allerdings nicht sehr genau; sie massen die beiden Kerndurchmesser in der Kulturaufsicht und bestimmten daraus die Fläche des umschreibenden Rechteckes. Dass diese Methode mangelhaft ist, geht auch aus ihren eigenen Befunden hervor: wenn sie (aus den Flächen) die Volumina der Frequenzmaxima zweigipfliger Verteilungskurven bestimmten, so erhielten sie Verhältnisse von 1:1,5 anstatt von 1:2, wie es nach der Jacoby'schen Regel zu erwarten wäre. Ein weiteres Hinderniss bei diesen Untersuchungen war das arithmetische Einteilungsprinzip. Die Kurven fielen damit unregelmässig aus und aus diesen Unregelmässigkeiten wurden dann unberechtigte Folgerungen abgeleitet. Für Kerne embryonaler Organe (z. B. tubuli contorti der menschlichen Niere) stellten Wermel und Ignatjewa eine viel breitere und flachere Frequenzverteilungskurve fest als für die Kerne des erwachsenen Organes. Der daraus gezogene zu weit gehende Schluss lautet: „wir glauben, dass diese Erscheinung als Zunahme des integrierenden Einflusses des Organismus auf die Zelle und gleichzeitig als Wirkung der Spezialisierung zu betrachten ist. Mit anderen Worten, die Grundmasse der Zellen unifiziert sich mit der Differenzierung und wahrscheinlich wird durch den koordinierenden Einfluss des Organismus die Individualität der Zellen vertauscht.“ Zur Untersuchung dieser Zell-„Individualität“ bestimmten Wermel und seine Mitarbeiter die Kerngrößen an weiteren Gewebekulturen, wobei sie fanden, dass z. B. die Kerne des Samendrüsenepithels des Frosches das 5,8-fache Volumen in der Kultur gegenüber den nicht kultivierten Zellen aufweisen. Auch glaubten sie, unter Vorraussetzung, dass die Kern-Plasma-Relation sich in der Kultur nicht ändert, dass man „schon vom ersten Blick sehen kann, dass Zellen, die sich zum explantierten Stückchen näher befinden, kleiner sind“ als die Zellen in der Kulturperipherie. (Die gefundenen Unterschiede betrugen 40%). Als Schlussfolgerung schreiben sie: „es darf also von einer Verkleinerung der Zellendimensionen in situ gesprochen werden, die ein Ausdruck des Einflusses des Gesamtorganismus ist, das heisst die Zelle ist kleiner als sie sein könnte und als ihr als selbstständiges System zukäme.“ Und all dies unter gänzlicher Vernachlässigung der dritten Dimension!

Neu aufgegriffen wurde die Frage der Kernvolumina bei Züchtung in vitro von Bucher und einigen Mitarbeitern (1950 ff.), die Fibroblasten, sowie Myo- und Osteoblasten verschiedener Species untersuchten. Diese Forscher entwickelten eine spezielle Methodik und kontrollierten ihre Ergebnisse nach allen Regeln der modernen Statistik. Die durch Planimetrie der Kernflächen aus der Kulturaufsicht gewonnenen Werte wurden - getrennt für zentrale und periphere Teile des Wachstumsschleiers - auf logarithmischer Basis geordnet. Es ergaben sich zwei Häufungen in Grössenklassen, die um den Faktor $1,5875 = \sqrt[3]{4}$ differieren. Bucher schreibt dazu: „wir sind ursprünglich von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass die dritte im Totalpräparat nicht messbare Achse beim Grösserwerden der Kerne den andern beiden, dem Deckgläschen mehr oder weniger parallel liegenden und somit gut messbaren Achsen proportional zunimmt. Dass diese unseren weiteren Berechnungen zugrunde liegende Voraussetzung richtig ist, zeigt neben den an Schnittpräparaten vorgenommenen Messungen des dritten Durchmessers* vor allem auch die Tatsache, dass wir mit der Anwendung unserer Methode zur Auswertung von bisher 50.000 Kernen in Gewebekulturen gute Resultate erhalten haben.“ In Anlehnung an Wermel und Ignatjewa bestimmte Bucher die Kerngrössen getrennt für die Innen- und Aussenzone des Wachstumsschleiers; er fand, dass die Kernvolumina der Innenzone gleich denen des unkultivierten Gewebes sind, die Kerne der Aussenzone dagegen das doppelte Volumen zeigen. Schon Wermel und Ignatjewa hatten festgestellt, dass die Kerne bei längerer Züchtungsdauer „viel kleiner“ werden; Bucher beobachtete, dass die Kerne (in derselben Passage) mit längerer Züchtungsdauer „etwas kleiner“ werden, ohne dass die Maxima der Verteilungskurve sich verschieben würden. Diese Unterschiede sind zwar statistisch gesichert, doch waren sie nicht grösser als die individuelle Schwankungsbreite verschiedener Kulturen. Bei unter gleichen Bedingungen gezüchteten Schwesterkulturen konnte Bucher keine Differenzen der Kerngrössen feststellen. Interessant ist sein Befund, dass in ein Tage alten Kulturen, deren Randschleier noch nicht in Innen- und

* Es ist bedauerlich, dass Bucher keine ins Einzelne gehenden Messresultate oder Mikrophotographien der Schnitte publiziert hat. Als Vergleichsmaterial käme solchen erhebliche Bedeutung zu.

Aussenzone differenzierbar ist und ebenso in der Aussenzone von zweitägigen Kulturen das Frequenzmaximum der Kernvolumina in der Mittelklasse zwischen der Regelklasse des unkultivierten Gewebes und der nächsthöheren liegt. - Im Gegensatz zu Freerksen (1933), welcher glaubte, dass sich in der Kultur dieselben Volumina wie im unkultivierten Zustand vorfinden, kommt Bucher auf Grund seiner Befunde zu dem Schluss, „dass in vitro keine willkürliche Änderung der Kerngrössenverhältnisse zustande kommt, doch fällt das Frequenzmaximum in der Aussenzone nicht in die gleiche Regelklasse wie in vivo, sondern in die dem doppelten Kernvolumen entsprechende.“ Als Ursache gibt Bucher die grosse Teilungstendenz der Aussenzone an, währenddem die Zellen im unkultivierten Gewebe oder in der Innenzone des Kulturrandschleiers schon anderweitig funktionell tätig sind - z. B. extrazelluläre Strukturen bilden, wodurch auch ein regerer Stoffaustausch nötig wird, welcher durch eine grössere relative Oberfläche (kleineres Volumen) begünstigt wird.

Die Fragen welche zur vorliegenden Arbeit Anlass gaben, waren folgende:

1. Sind die von Bucher genauer analysierten Grössenunterschiede der Kerne im zentralen und peripheren Teil des Wachstumschleiers von Fibroblastenkulturen für diese Zellart spezifisch, oder kommen sie auch in Kulturen anderer Gewebe, z. B. von Leberzellen vor?
 2. Wenn sich in Leberkulturen eine Tendenz zur Zellvergrösserung gegenüber dem Mutterstück zeigen sollte
 - a) bestehen auch Differenzen zwischen den zentralen und peripheren Teilen des Randschleiers?
 - b) halten sich diese an die Jacoby'sche Verdoppelungsregel?
 3. Reichen die bisher an Gewebekulturen angewandten Methoden der Kerngrössenbestimmung aus, um eine eventuelle Volumenänderung zuverlässig zu ermitteln?
 4. Lassen sich in der Gewebekultur ursächliche Faktoren für eine eventuelle Kerngrössenänderung feststellen?
-

B. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Als Untersuchungsobjekt diente die Leber, da ihre Kerne normalerweise kugelig sind und bei der Abplattung in der Kultur zu Scheiben werden müssen - beides geometrische Körper, deren Volumen relativ leicht und genau zu bestimmen ist. Das ist als besonderer Vorteil hervorzuheben gegenüber Fibrocytenkernen, zumal wenn letztere noch abgeplattet werden. Da die Verhältnisse durch die verschieden starke Abflachung in der Kultur schon an sich kompliziert genug sind, war es wesentlich, ein Material zu untersuchen, das bei der Volumenbestimmung nur möglichst kleine Fehler bedingen konnte; Kerne sind ja nie ideale geometrische Körper, sodass eine Volumenbestimmung immer nur eine mehr oder minder gute Annäherung an die Wirklichkeit sein kann.

I. HÜHNCHEN

1. MATERIAL UND METHODE

Embryonen im Alter von 9, 10 und 11 Tagen wurden untersucht, um eine möglichst geringe Streuung zu erhalten, da nach Keller (1933) mit zunehmendem Alter des Embryos dessen Zellkerne etwas kleiner werden, wie sie gerade für die Hühnchenembryoleber gezeigt hat. Die Wahl des ersten Untersuchungsobjektes fiel auf das Hühnchen, da zunächst ein Material herangezogen werden sollte, dessen Frequenzverteilungskurve für Kerngrößen (Birkenmayer, 1934) eingipflig ist. Vorzüglich bei solchen Kernen würde sich ja eine Differenz, entweder im Sinne einer Verschiebung des Maximums oder eines zweiten Gipfels, klarstellen lassen, wenn ein solcher Unterschied rein durch die Verhältnisse in der Gewebekultur bedingt wäre.

Um die gestellten Fragen beantworten zu können, wurde auch je ein Stück der unkultivierten Leber direkt fixiert (in dieser Arbeit als „Leber in vivo“ bezeichnet) und ihre Kerne dann gemessen. Fixiert wurde in Carnoy, in Paraffin eingebettet, in 8 μ dicke Schnitte zerlegt und mit Hämalaun gefärbt.

Die ersten Explantate wurden als Deckglaskulturen im hängenden Tropfen angelegt. Von der zweiten oder dritten Passage an, je nach Wachstumsintensität, wurden die Kulturen mit inaktiviertem Ex-

trakt nach Doljanski (1929) gezüchtet, um die Wucherung der Fibroblasten zu hemmen und dadurch den Leberparenchymzellen Gelegenheit zur Entfaltung zu geben. Oberflächenkulturen wurden gleich behandelt, aber im liegenden Tropfen gehalten. Zur Messung wurden die Kulturen eine halbe Stunde im Wärmeschrank (bei der Züchtungstemperatur von 39°C) in Carnoy fixiert, mit Mayer's Hämalaun gefärbt und als Totalpräparate über die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol in Canadabalsam eingeschlossen.

Querschnitte durch Kulturen wurden von durchgemessenen Präparaten angefertigt, indem sie aus dem Balsam gelöst, in Paraffin eingebettet und 8 μ dick geschnitten wurden, worauf wieder Balsam-Einschluss erfolgte. Zur Messung benützte ich eine Ölimmersion mit 1500-facher Vergrößerung, zeichnete die Kerne mittels eines Prismas und mass dann die Zeichnungen, ein Verfahren, welches genauer zu sein scheint als die direkte Messung mit dem Okularmikrometer. Bei den Lebern in vivo wurden Kernlänge und -breite gemessen und dann das Volumen nach der bekannten Formel für Rotationskörper: $V = \frac{4}{3} \pi \cdot r^3$ bestimmt. Auf die genauere Bedeutung des Faktors r (Radius) werde ich noch einzugehen haben. Bei den Kulturaufsichten begnügte ich mich mit einer Flächenbestimmung (nach: Fläche = πr^2), da ich wegen der bekannten Abplattung nicht annehmen durfte, dass es sich bei diesen Kernen um Kugeln handle. Ausgewertet wurden die Befunde nach Hintzsches logarithmischer Einteilung, die auch Bucher angewandt hat. Für jede Bestimmung mass ich 100 Kerne, ausser in einzelnen Fällen, in welchen mir nur eine geringere Zahl zur Verfügung stand.

2. BEFUNDE

a) *Histologisches und Nomenklatur.*

Die Kulturen zeigen, je nach Züchtungsdauer und Wachstumsintensität, einen mehr oder weniger grossen Randschleier. Er enthält verschieden viel und verschieden grosse Leberzellnester, die vom Explantat ausgehen und in gut gewachsenen Präparaten miteinander verschmolzen sind. Mitosen sind in den Fibroblasten, kaum aber in den Leberzellen selbst zu sehen. Die Leberzellkerne erscheinen rund oder etwas länglich - wie die Kerne in vivo auch - sie besitzen einen oder zwei Nucleoli. Um das Explantat herum

hat sich in allen Kulturen eine verschieden stark ausgeprägte Schale von Fibroblasten gelegt, welche ich als Abgrenzung des Mutterstückes gegenüber dem Randschleier ansehe. Schon bei blosser Betrachtung gewinnt man den Eindruck, dass die Kerne der Peripherie grössere Durchmesser aufweisen als die Kerne in den zentraleren Teilen des Randschleiers.

Als Nomenklatur wurde das von Jacobj eingeführte Schema beibehalten. Die „Regelklassen“ verhalten sich danach zueinander wie 1 : 2 : 4 etc. Die durch Unterteilung der Intervalle zwischen den Regelklassen zustande kommenden Gruppen sind „Zwischenklassen“, deren mittlere die „Mittelklasse“. Es ist üblich, den Intervall zwischen zwei Regelklassen in drei Zwischenklassen zu unterteilen. „Kerngrösse“ und „Kernvolumen“ gebrauche ich synonym.

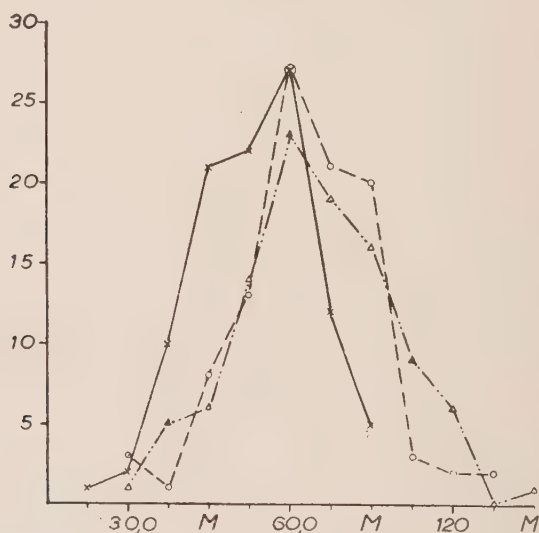


Abb. 1. Kerngrössen Frequenzverteilungskurve von drei Hühnchenembryolebern, ohne Kultur (10 & 11 Tage alt), Ordinate: Frequenz in %, Abszisse: Volumen in μ^3 .

b) Die Leber in vivo.

Verteilungskurven der Kerngrössen für die Leber in vivo wurden mehrfach bestimmt, um eine Vergleichsbasis zu den Kulturen zu erhalten. Übereinstimmend zeigt sich bei Untersuchung von drei

Fällen, dass die grösste Häufung bei $60 \mu^3$ liegt, eine Feststellung welche gut mit den Befunden von Jacoby an der erwachsenen Hennenleber übereinstimmt: er fand dort $61,6 \mu^3$ (veröffentlicht bei Birkenmayer, 1934). Die kleine Differenz der beiden Werte dürfte auf Schrumpfungsvorgängen beruhen: Jacoby fixierte in Susa - d. h. in wässriger Lösung, währenddem ich in alkoholischer Lösung (Carnoy) fixierte. Diese recht eindeutige Übereinstimmung ist insofern etwas merkwürdig, als verschiedentlich in der Literatur Angaben zu finden sind, nach welchen die embryonalen Organe andere Kerngrössen als die des Erwachsenen enthalten sollten. Keller z. B. fand, worauf schon oben hingewiesen wurde, dass beim Hühnchen mit zunehmendem Embryonalalter die grösseren Kerne verschwinden; frühembryonal war die Frequenzverteilungskurve eingipflig, um den 9. Tag zweigipflig und später, wie auch (über ein weiteres Zweigipfelstadium) im erwachsenen Zustand wieder eingipflig.* (Diskussion über diese Fragen s. auch bei Teir, 1944 und Helweg-Larsen, 1952.) Weiterhin glaubte Keller festzustellen, dass die Kernverteilung in der embryonalen Hühnchenleber sich nicht im Sinne der Hypothese des proportionalen Kernwachstums auswerten liesse - eine Beobachtung welcher ich mich, nach dem oben gezeigten, nicht anschliessen kann; es ist hierbei allerdings zu bedenken, dass Keller ihre Untersuchungen nur an je 50 Kernen ausführte.

An den Kurven der Abb. 1 fällt weiterhin auf, dass sie erstens Treppenbildung zeigen und zweitens, dass diese Treppen teils vor, teils hinter den Hauptgipfel zu liegen kommen. Es ist dies eben ein Verhalten welches auf starkes Wachstum hindeutet, auf ein „Gewebe in Bewegung“. Eine normale Glockenkurve ist nach Hintzsche ja nur dann zu erwarten, wenn das Gewebe sich in „besonders ausgeglichenem Zustand“ in Bezug auf Zelltod und Zellnachschiebung befindet; embryonales Gewebe kann natürlicherweise nicht in einem solchen Idealzustand sein.

* Kellers Maxima in mm^3 (bei 1500-facher Vergrösserung):

4.	5.	8.	9.	14.&15.	16.Tag	geschlüpft	erwachsen
125	76,8	76,8/91	52,8/76,8	42,9	27/34,4	52,8	64

Aber bei verschiedenen Tieren gleichen Alters fand sie manchmal verschiedene Werte (z. B. 6. Tag: 64 und 91 mm^3).

c) Aufsichten auf die Kulturen.

Unter Anlehnung an Bucher unterteilte ich die Randschleier der Kulturen in Innen- und Aussenzonen. Da aber die runden Leberzellen der Abplattung in der Kultur stärker ausgesetzt sind als die schon ohnehin flachen Fibroblasten, musste meine Unterteilung noch weiter gehen als die Buchers, um möglichst klare Befunde zu erhalten. Daher kam ich zu drei Zonen rings um das Explantat: a) im Umkreis von 0 - 150 μ , b) im Umkreis von 300 - 450 μ und c) im Umkreis von 600 - 750 μ . Wie schon erwähnt, berechnete ich nur die Fläche des Kernes, wie sie in der Aufsicht erscheint, d. h. also die Fläche des optischen Querschnittes; ebenso wurden die Kerne der entsprechenden Leber in vivo berechnet. Von der Querschnittsfläche einer abgeplatteten Kugel auf deren Volumen zu schliessen ist nach Berechnungen von Hintzsche nur möglich, wenn der Grad der Abplattung bekannt ist. Da mir bei der Aufsicht der Abplattungsgrad unbekannt blieb und es immerhin möglich war, dass eine gewisse Kernvolumenzunahme mit hinein spielt, konnte es selbstverständlich bei dieser ersten Berechnung auf nicht mehr ankommen als auf die Abklärung der Frage, ob sich überhaupt Kernflächenhäufungen ermitteln lassen. Trotz beider Unbekannten ergab sich die Berechtigung zu diesen Messungen daraus, dass ich den Randschleier in Zonen unterteilte, deren jede eine ziemliche Konstanz der Abplattung und des Volumens (wenn es eben ein konstantes Volumen in einer bestimmten Zone der Kultur gab) aufweisen müsste.

Das Ergebnis einer solchen Messung zeigt Abb. 2. Tatsächlich lassen sich Häufungen nachweisen, wobei die Kerne der Leber in vivo die kleinste Fläche haben (Häufungsmaximum bei 16,25 μ^2), während in der Kultur die Fläche bis auf mehr als das Vierfache steigt. Es ist auffällig, dass die Kurven umso breiter werden, je weiter peripher die Zonen liegen; so umfasst

die Leber in vivo	5 Klassen,
der zentrale und der mittlere Randschleier je	6 Klassen
und der periphere Randschleier	* 8 Klassen.

In manchen Fällen ist diese Streuung noch viel stärker ausgesprochen, besonders nach den kleinen Klassen zu. Diese stärkere Streuung in der Peripherie wurde auch schon früher beobachtet, insbesondere von Forschern, welche die Grössenklassen arithme-

tisch einteilen (z. B. Wermel und Ignatjewa), da dann in den höheren Grössenordnungen die Streuung sich noch viel stärker auswirken muss als bei den kleinen Kernen (bzw. kleinen Flächen der Kerne). Als Ursache für diese Streuungszunahme, welche auch für das Kernvolumen gilt (s. z. B. u. Tab. 4), ist das intensivere Wachstum in der Kulturperipherie angegeben worden (Bucher).

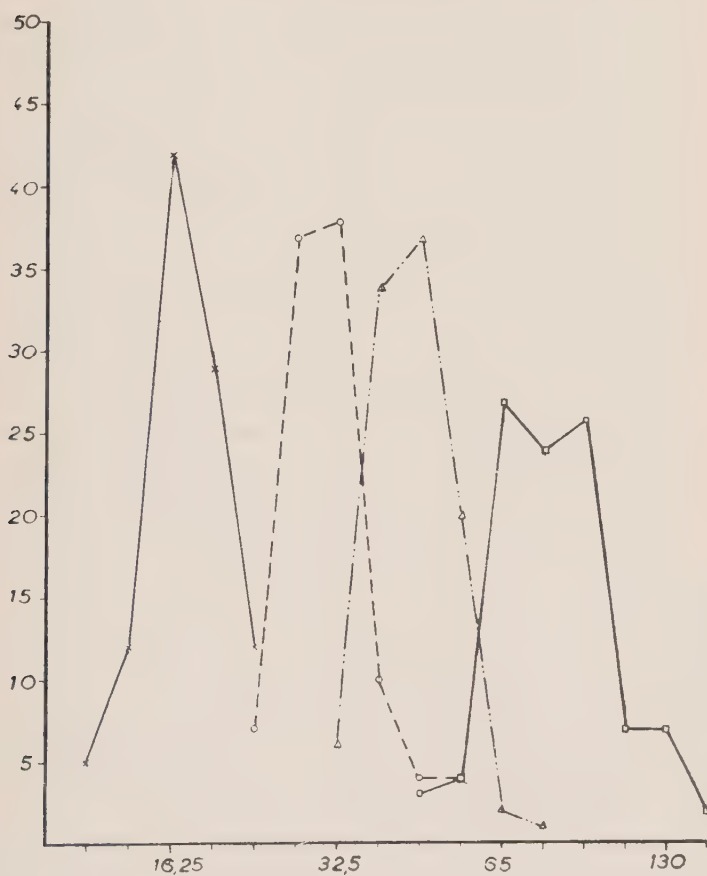


Abb. 2. Frequenzverteilungskurve der Flächen des optischen Querschnittes, wie er in der Aufsicht erscheint, einer Leber in vivo und Kultur derselben Leber (2. Passage, Passagedauer: 3 Tage). Von links nach rechts: Leber in vivo, zentrale, mittlere und periphere Randschleierzone. Ordinate: Frequenz in %, Abszisse: Fläche in μ^2 .

d) Oberflächenkulturen.

Es war zu erwarten, dass Querschnitte durch die Kulturen genaueres über den Grad der Abplattung der Kerne zeigen würden. Da aber auch dabei nur zwei Dimensionen bestimmt werden können, erschien es doch nicht unwesentlich, eine Beweisführung für die Bedeutung der Oberflächenkräfte auch aus der Aufsicht abzuleiten. - Die Oberflächenspannung welche auf die Gewebekulturen wirkt und die Zellen abplattet, wird auf die Tätigkeit der Zellen selbst zurückgeführt, da sie im leeren Wachstumsmedium oder im Medium ausserhalb der Kultur nicht nachweisbar ist (Fischer, 1946); ihre genaue Natur ist noch nicht völlig klagestellt.

Oberflächenkulturen dienten dieser Beweisführung. Tab. 1 zeigt die Kernflächenverteilung für die Randschleierzone 0-150 μ um das Explantat bei einer solchen Oberflächenkultur, welche vom selben Tier stammt wie die Kulturen der Abb. 2. Es zeigt sich,

μ^2	27,3	32,5	38,7	46,0	54,7	65,0	77,3	91,9
%	1	4	11	25	28	23	6	2

Tab. 1. Verteilung der optischen Querschnittsflächen einer Oberflächenkultur, aus dem zentralen Randschleierbereich, entsprechend der zweiten Kurve von links der Abb. 2. (Kultur vom selben Tier — 10 Tage alter Hühnchenembryo —, selbe Passage und Passagendauer wie Abb. 2.)

dass schon in dieser Zone Flächen vorherrschen, welche bei gewöhnlichen Kulturen im hängenden Tropfen erst in weiter peripher liegenden Zonen deutlich hervortreten. Da dieses Verhalten konstant war, die Oberflächenkulturen sich von den Gewöhnlichen aber nur in den Spannungsverhältnissen unterschieden, mussten diese die Differenz der Kernflächen bedingen.

Bei allen bisherigen Messungen konnte noch nicht geklärt werden, ob die Flächenzunahme, welche für sich allerdings schon ursächlich auf die Spannung zurückgeführt werden konnte, nur auf Abplattung oder auch auf Volumenzunahme beruht. Diese Frage liess sich an Kulturquerschnitten entscheiden.

e) Kulturquerschnitte.

Bei der mikroskopischen Betrachtung von Schnittpräparaten fällt auf, dass im Explantat wohl in den tiefen Schichten runde Kerne liegen, dass aber die Kerne an der Oberfläche etwas abge-

plattet sind. Richtet man aber den Blick auf den Randschleier, so sind runde Kerne gar nicht mehr zu sehen: sie sind alle platt gedrückt - im Extremfall über $20\text{ }\mu$ lang und weniger als $2\text{ }\mu$ dick. Die Kerne haben also, wenn wir uns die Kreisform im Aufsichtsbild des Totalpräparates in Erinnerung rufen, Discusform (Abb. 3)

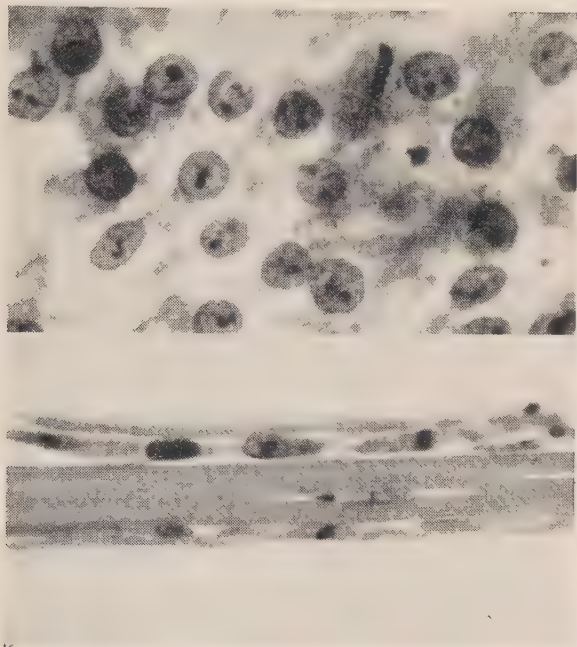


Abb. 3. Oben: Aufsicht, unten: Querschnitt eines Kulturrandschleiers. Mikrophotographie, Vergrößerung 1000-fach

Um das Volumen dieser Kerne quantitativ bestimmen zu können, musste die Berechnungsformel dementsprechend geändert werden. Für kugelhähnliche Rotationskörper (Rotationsellipsoide) gilt die Formel: $\text{Volumen} = \frac{4}{3} \cdot \pi r^2 R$ (a), wenn wir mit r den kleinen, mit R den grossen Radius bezeichnen. Disci hingegen lassen ihr Volumen nach: $\text{Volumen} = \frac{4}{3} \cdot \pi r R^2$ (b) berechnen. Abb. 4 soll diese Verhältnisse in etwas schematisierter Form veranschaulichen. (Weiteres zur Frage der Berechnung s. u. „Kernform und Kernvolumenberechnung.“)

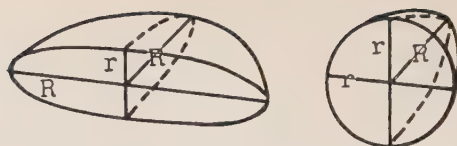


Abb. 4. Zu den Verhältnissen der Radien verschiedener Rotationskörper. Rechts: disciformer Körper, links: kugelähnliches Rotationsellipsoid.

In Tab. 2 ist die Verteilung der Kernvolumina für ein Mutterstück (Formel *a*) und den zugehörigen Randschleier (Formel *b*)

Klasse	μ^3	in vivo	M. st	Schl
M	21,2		1	
Z	25,2		1	
$K_{1/4}$	30,0	1	5	
Z	35,7	3	5	1
M	42,4	10	6	3
Z	50,4	18	11	7
$K_{1/2}$	60,0	23	19	12
Z	71,3	13	11	10
M	84,8	18	16	22
Z	101	8	12	14
K_1	120	2	6	14
Z	143	2	4	11
M	170	2	3	5
Z	202			1

Tab. 2. Kernvolumenverteilung einer Leber in vivo und eines Querschnittes durch eine Kultur dieser Leber; Mutterstück berechnet nach Formel *a*, Randschleier nach Formel *b*. (9 Tage alter Hühnchenembryo. Kultur: 3. Passage, Passagendauer: 5 Tage).

dargestellt; der Randschleier ist nicht in Zonen unterteilt worden. Im Mutterstück zeigen sich Maxima bei $60 \mu^3 = K_{1/2}$ und bei $84,8 \mu^3$, der darauf folgenden Mittelklasse. Doch braucht dies nicht zu verwundern, denn die zugehörige Leber in vivo (Tab. 2) lässt das gleiche Verhalten erkennen. Es handelt sich um einen 9-tägigen Embryo, dessen Leber ja auch nach Keller eine zweigipflige Kurve aufweist. Im Randschleier hat die Reihe eine Häufung bei $84,8 \mu^3$; Nebenhäufungen kommen bei 60 und $120 \mu^3$ vor. Das heisst also:

der Randschleier hat wirklich etwas grössere Kerne, wenn auch bei weitem nicht in dem Ausmass wie sie Wermel und Bucher gefunden haben. Insbesondere ist zu betonen, dass es nicht zu einer Verschiebung des Maximums in die nächsthöhere Regelklasse gekommen ist.

Um diesen Befund zu erweitern, wurden noch Leberzellkerne von Säuger-Embryonen untersucht. Da beim Huhn die Kernvolumina schon normalerweise nur um 1 Maximum streuen, erschien es möglich, dass sich die Tendenz zur Kernvergrösserung bei Tieren mit Häufungen in verschiedenen Klassen stärker zeigen würde.

II. MEERSCHWEINCHEN

1. MATERIAL UND METHODE

Explantiert wurde die Leber von Cavia-Föten kurz vor der Geburt. Die Kulturen wurden wie für das Hühnchen beschrieben angelegt, in Paraffin über Methylbenzoat-Celloidin eingebettet und 6 μ dick geschnitten. Ich zeichnete bei 1800-facher Vergrösserung und mass wo immer möglich je 100 Kerne. Wie bei dem Hühnchen wurde auch hier ein Teil der Leber „in vivo“ direkt in Carnoy fixiert.

2. BEFUNDE

a) *Histologisch.*

In den Querschnitten der verhältnissmässig dicken Explantate sind die Kerne im allgemeinen rundlich. Die Kerne des Schleiers springen perlschnurartig vor, im Gegensatz zu den Schnitten der kultivierten Hühnerleber, bei denen die Oberfläche des Schleiers nicht wellig ist, weil dessen Kerne noch stärker abgeplattet sind. Es sei schon hier vorweg genommen, dass beim Menschen der Schleier eine Zwischenstellung zwischen diesen beiden Extremen einnimmt. Wodurch diese Unterschiede bedingt sind, liess sich nicht feststellen - vielleicht beruhen sie auf verschiedenem Fermentgehalt (fibrinolysinähnliche Fermente?).

b) *Die Verteilung der Kernvolumina.*

Tab. 3 zeigt die Kerngrössenverteilung für die Leber in vivo (K_1 bei $136\mu^3$). Die Verteilung ist - der Species entsprechend - zweigipflig, mit Maxima bei $K_1 = 136\mu^3$ und der nächstfolgenden

Mittelklasse. In der gleichen Tabelle sind die Befunde an zwei Kulturen angeführt, welche ein gleiches und interessantes Verhal-

Klasse	μ^8	in vivo	Kultur A.		Kultur B.	
			M. st	Schl	M. st	Schl
Z	14,3				1	
K _{1/8}	17,0		1		1	
Z	20,2		2			
M	24,0		1			
Z	28,6		2			
K _{1/4}	34,0	2	4		2	
Z	40,4	1	13		8	1
M	48,1	3	11	1	13	
Z	57,2	2	15	1	16	7
K _{1/2}	68,0	3	17	1	19	5
Z	80,8	6	14	4	18	8
M	96,1	8	7	4	15	5
Z	114	17	7	9	4	10
K ₁	136	23	2	10	2	10
Z	165	12	2	14		8
M	192	16	1	13	1	10
Z	229	4	1	19		13
K ₂	272	2		14		12
Z	323	1		5		8
M	385			5		1
Z	457					2

Tab. 3. Kernvolumen-Verteilung für eine Leber in vivo, Mutterstück und Randschleier (Querschnitt) von zwei Kulturen Leber. (Meerschweinchenembryo, kurz vor Geburt. Kulturen: 2. Passagendauer: 3 Tage).

ten zeigen. Die Mutterstücke haben ihr Maximum bei K_{1/2}, während die Randschleier ein Maximum in der Zwischenklasse vor K₂ aufweisen, wobei K₂ selbst noch deutlich vertreten ist. Das Plateau, welches in der einen Kultur nur allmählich zum Maximum hinführt, beginnt in beiden Fällen in der Zwischenklasse unter K₁. Die Verkleinerung der Kerne im Mutterstück gegenüber denen der Leber in vivo ist möglicherweise degenerativen Veränderungen zuzuschreiben. Im Randschleier weicht die Verteilung der Kernvolumina von der Jacoby'schen Verdoppelungsregel ab. Dies lässt

sich nur durch den etwas vagen Begriff eines „speziellen Funktionszustandes“ erklären, ist doch heute bekannt (Alfert und Bern, 1951), dass Kerne ihr Volumen nicht nur durch Nucleinsäure-Zunahme - im Sinne der Verdoppelungsregel - vergrössern, sondern auch eine Volumvermehrung durch Protein-Anlagerung erfolgen kann. Es ist also nicht verwunderlich, wenn einmal eine Kernreihe eine Ausnahme von der Jacoby'schen Regel macht, vielmehr ist es bei dieser Kenntnis erstaunlich, dass das Gesetz des proportionalen Kernwachstums sich so häufig bestätigen lässt.

III. MENSCH

1. MATERIAL UND METHODE

Es wurden Kulturen der Leber von zwei 5 cm langen menschlichen Föten ausgewertet.

Die angewandte Methode entspricht der beim Meerschweinchen angegebenen, nur wurden hier die Kernvolumina der Explantate entweder nach Formel *a* oder nach Formel *b* berechnet - entsprechend der jeweiligen, in den Schnitten ermittelten Kernform. Da die Randschleierkerne nur disciform waren, wurden sie, wie üblich, nach Formel *b* berechnet.

Zum Unterschied von den früheren Kulturquerschnitten (Hühnchen und Cavia) untersuchte ich hier den Randschleier in zentrale und periphere Zone gesondert.

2. BEFUNDE

a) Histologisch.

Hervorzuheben ist hier, dass die Kerne im Mutterstück bei den Kulturen von menschlichen Embryonen in den peripheren Teilen auch manchmal etwas abgeplattet waren. Zweitens wäre zu erwähnen, dass sich in diesen Kulturen das Mutterstück nicht gegen den Schleier durch Fibroblasten abgrenzte, dass vielmehr der Übergang fließend war. Über den allgemeinen Grad der Abplattung der Randschleierkerne wurde schon vorstehend (S. 17) berichtet.

b) Die Verteilung der Kernvolumina.

In Tab. 4 ist die Verteilung der Kerngrößen bei der Leber in vivo dargestellt; sie zeigt zwei deutliche Maxima (K'_1 und K_1),

Klasse	μ^3	1	2	3	4	5	6	7	8
		in vivo	Kultur A.				Kultur B.		
			Mst. p	Mst. z	Schl. z	Schl. p	Mst.	Schl. z	Schl. p
M	48,1	3							
Z	57,2	3		1					
K _{1/2}	68,0	9	1	1		1			
Z	80,8	3	1		3	2		2	1
M	96,1	5	6	11	3	4	2		1
Z	114	16	16	14	20	7	2	2	2
K ₁	136	17	24	25	22	14	12	3	3
Z	165	15	21	17	15	20	28	3	3
M	192	12	14	18	19	21	29	11	14
Z	229	8	13	9	12	18	15	17	14
K ₂	272	9	4	3	3	5	6	36	23
Z	323				3	2	3	11	14
M	385					4	3	7	11
Z	457			1		1		4	12
K ₄	544							4	
Z	647								
M	769					1			2

Tab. 4. Kernvolumenverteilung für eine Leber in vivo und zwei Kulturen dieser Leber (Querschnitte). Kultur A: Mutterstück zentral und peripher gesondert untersucht (s. Text). Beide Kulturen: Randschleier in zentrale und periphere Zone unterteilt. (Menschlicher Embryo, 5 cm lang. Beide Kulturen: 2. Passage, Passagendauer: 4 Tage).

wobei die zweite Häufung ziemlich breit streut. Diese Zahlenreihe entspricht dem Alter des Embryos (Clara).

Die Kerne der Zellen in Kultur zeigen folgendes Verhalten, Tab. 4: das Mutterstück wurde an zwei Stellen untersucht; die eine Kolonne (2) zeigt die Kernvolumina bei einem Schnitt durch die Peripherie des Mutterstückes, wo sich abgeplattete Kerne fanden (dementsprechend nach Formel *b* berechnet), die andere (3) durch das Zentrum (runde Kerne, Formel *a*). Beide Reihen haben ihr Maximum bei K₁ während das Zentrum noch einen kleinen Gipfel bei M über K₁ zeigt; in beiden ist K_{1/2} praktisch nicht mehr vertreten. Der Randschleier derselben Kultur (Tab. 4, Kol. 4 & 5) hat nahe dem Mutterstück sein Maximum bei K₁ und einen deutlichen

Nebengipfel bei M darüber; die Kerne in der Schleierperipherie streuen um die Klasse 192 μ^3 .

Tabellarisch zusammenfassend haben wir:

	$K_{1/2}$	M	K_1	M
Leber in vivo	+		++	
Mutterstück zentral			++	(+)
Mutterstück peripher			++	
Schleier zentral			++	+
Schleier peripher				++

Von den kleinen Unterschieden im Mutterstück selbst abgesehen heisst das: wir haben von der Leber in vivo zum Mutterstück eine Verschiebung der Kernvolumina nach oben ($K_{1/2}$ verschwindet im Mutterstück) und desgleichen noch einmal vom Mutterstück zum Randschleier, aber nur um zwei Zwischenklassen; dabei liegt zu- meist das Maximum bei K_1 - nur die Kerne im peripheren Teil des Schleiers haben sich in der nächstfolgenden Mittelklasse gehäuft.

Ein etwas anderes Verhalten weist eine zweite Kultur desselben Embryos auf (Tab. 4, Kol. 6-8): bereits das Mutterstück hat grössere Kerne, in der Mittelklasse über K_1 gehäuft; im Randschleier liegt sowohl zentral wie peripher das Maximum bei $K_2 = 272 \mu^3$

Man kann also für Kerne aus Kulturen menschlicher Leber sagen:

- a) es findet keine Aufsplitterung in mehr Gipfel, als die Ausgangsleber aufweist, statt;
- b) Die Kerne zeigen eine Tendenz zur Vergrösserung, welche sich aber von der Leber in vivo bis zum peripheren Randschleier auf maximal einen Verdoppelungsschritt beschränkt, wobei darauf hinzuweisen ist, dass schon bei der Leber in vivo eine Häufung bei K_1 angedeutet ist; gegenüber dem Mutterstück sind die Kerne des Randschleiers nur um 2 Zwischenklassen vergrössert.

C. DISKUSSION

I. ZUSAMMENFASSUNG DER BEFUNDE

	in vivo	M. st	Schleier	
			zent	per
Hühnchen	1	1	1,5	
Meerschweinchen	1	0,5	1,5	
Mensch	1	1	1	1,5
	1	1,5	2	2

Tab. 5. Die Volumenvergrößerung der Kerne (am Häufungsort der betreffenden Verteilungsreihe) in den verschiedenen Regionen der Kultur (Mutterstück, zentraler und peripher Randschleier), aus dem Kulturquerschnitt, verglichen mit dem Kernvolumen der zugehörigen Leber in vivo, welches gleich 1 gesetzt wurde.

In Tab. 5 sind unsere Befunde zusammengestellt. Man sieht, dass die Häufung der Kernvolumina in den peripheren Randschleiern jeweils in einer Grössenklasse liegt, welche ein andert-halb oder doppelt so grosses Volumen aufweist als die Häufungs-klasse der zugehörigen Leber in vivo.

Es stellt sich nun die Frage, was diese Volumenzunahme besagen will. Man könnte meinen, dass die gefundene Kerngrössenzunahme einen Schritt zur Kernteilung darstelle und wo die Kerne noch nicht das Doppelvolumen erreicht haben, dort sind sie eben zu früh fixiert worden. Dass dem wahrscheinlich nicht so ist, zeigten Filme welche kürzlich von Prof. Hintzsche an lebenden Kulturen menschlicher Embryonen aufgenommen wurden.

II. DIE LEBERKULTUR-FILME

Diese Filme zeigten nämlich, dass die Proliferationszone der Leber-Kultur gar nicht im Randschleier liegt, sondern in den Randteilen des Mutterstückes. Die Randschleierzellen sind also allem Anschein nach nur, oder wenigstens hauptsächlich, heraus-geschobene Zellen, die peripheren älter als die zentralen. Nun erleiden aber diese Zellen eine Abplattung recht starken Grades. Um sich zu teilen, müssten sie sich aber abrunden können; doch die Spannung, welche eben diese Abplattung bedingt, lässt die

Abrundung gar nicht zu, die Zellen können sich nur noch vergrössern.

Die Frage beantwortend, welche Anlass zu dieser Arbeit gab, ist also zu sagen, dass die Zelle anscheinend selbst imstande ist ihr Kernvolumen konstant zu halten, falls nicht diese Regulationsfähigkeit durch exogene Faktoren beeinträchtigt wird, wie z. B. durch die Abplattung.

Für chemische Substanzen, wie das Colchizin, ist schon lange bekannt, dass sie durch Mitosehemmung zu einer Dysregulation der Kernvolumina führen (in der Gewebekultur - Bucher, 1939 ff.). Mechanische Faktoren sind bisher vernachlässigt worden; wie wir aus unseren Befunden sehen zu unrecht. Auch die Abplattung führt durch - mechanische - Mitosehemmung zu einer Störung in der Kerngrössen-Regulation.

III. DIE ABPLATTUNG DER KERNE UND DIE KERNVOLUMENBESTIMMUNG

1. ALLGEMEINES

Angeregt durch Befunde von Weiss unternahm Dügge (1937) Untersuchungen, mittels sehr eleganter Versuchsanordnungen, über den Einfluss von Zugspannungen auf Fibroblastenkulturen. Einer seiner für uns interessanten Befunde lautet: „an der Oberfläche des Plasmas verbreitern sich die Fibrocyten“. Nun hat Dügge mit erheblich grösseren Spannungen gearbeitet als sie in unserem Plasma-Extrakt-Tropfen auftreten können. Und doch sind eben diese Spannungen gross genug, um die Kerne derart abzuplatten, dass für viele Jahre die Ansicht geltend sein konnte, dass das Kernvolumen in der Peripherie des Randschleiers um einige Verdoppelungsstufen zunehmen würde. Mehr oder weniger bewusst haben frühere Untersucher das Mass der Kernabplattung vernachlässigt, z. T. weil ihnen dessen Bestimmung in Querschnitten der Kulturen zu wenig genau möglich erschien.

2. MASS DER ABPLATTUNG

Als Mass für die Abplattung der Kerne kann man ihre kurzen Durchmesser betrachten. In Tab. 6 sind die Verteilungsreihen für diese Durchmesser zusammengestellt, verglichen mit denen der

	Hühnchen		Meerschw.		Mensch	
	in vi	Schl.	in vi	Schl.	in vi	Schl.
1-1,8 μ		3				
2-2,8 μ		47		9		6
3-3,8 μ	6	45	1	21		47
4-4,8 μ	57	4	12	33	12	37
5-5,8 μ	32	1	35	26	22	7
6-6,8 μ	5		42	11	47	1
7-7,8 μ			10		18	2
8-8,8 μ					1	

Tab. 6. Verteilungsreihen (%) für die kurzen Kerndurchmesser der Lebern in vivo, verglichen mit denen der Kulturrandschleier.

Leberkerne in vivo. Aus der Tabelle geht die allgemein starke Abplattung zahlenmässig hervor. Ebenso sieht man, dass die Kerne der Hühnchenleber am stärksten abgeflacht sind, die der Meerschweinchenleber am wenigsten, was oben bei Besprechung der histologischen Befunde schon aus dem mikroskopischen Bild abgeleitet worden war.

Um zu untersuchen ob mit grösserem Längsdurchmesser des Kernes auch sein kleiner Durchmesser zunimmt - wie dies Bucher für die Fibroblasten abgeleitet hat - wurde Tabelle 7 erstellt. Es zeigt sich, dass bei den Leberzellen im Kulturrandschleier gerade mit grösserer Länge des Kernes seine Breite abnimmt.

	Hühnchen		Meerschweinchen		Mensch	
Lang	9-9,8	über 9,8	9-10,2	über 10,2	11-11,8	über 11,8
Kurz	3-3,8	2-2,8	4-4,8	3-3,8	5-5,8	4-4,8

Tab. 7. Grössere Kernlängsdurchmesser (Lang) verglichen mit den häufigsten kleinen Durchmessern (Kurz) dieser Kerne. Aus Randschleiern von Kulturquerschnitten. Angaben in μ .

3. MODELLVERSUCH

Um die Verhältnisse klar darzulegen wurde ein Modellversuch unternommen (Abb. 5). Plastelinkugeln gleicher Grösse wurden gemessen, sowohl in der „Aufsicht“ als auch im „Querschnitt“, also von der Seite und aus der Aufsicht die Fläche, aus der Seiten-

ansicht das Volumen berechnet. Dann wurde auf diese Kernmodelle ein Druck ausgeübt, ähnlich dem, welchen die Spannung in der Gewebekultur auf die Randschleier-Kerne ausübt. Abb. 5 zeigt eindeutig wie „gross“ die peripheren „Kugeln“ in der Aufsicht werden. Aus der Seitenansicht dagegen geht klar hervor, dass die Kugeln gar nicht grösser wurden, sondern nur plattgedrückt worden.

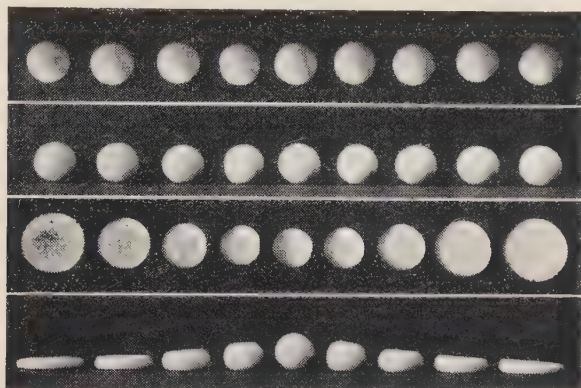


Abb. 5. Modellversuch. Von oben nach unten: Kugeln vor Druckausübung, Aufsicht, Seitenansicht („Querschnitt“); „Kugeln“ nach Druckausübung, Aufsicht, Seitenansicht. Der Druck wurde vom Zentrum aus nach beiden Seiten stärker - analog den Verhältnissen in der Kultur.

den sind. In diesem Zustand wurden die Modelle wieder gemessen und Fläche (Aufsicht) bzw. Volumen (Seitenansicht) bestimmt.

4. KERNFORM UND KERNVOLUMENBERECHNUNG

Die Berechnung des Kernvolumens geschieht nach den beiden obenerwähnten Formeln a und b (S. 15), wobei a für einen kugelähnlichen Rotationskörper, b für einen disciformen gilt. Doch um eine der beiden Formeln anzuwenden, muss die jeweilige (wirkliche) Kernform bekannt sein. Für Extremfälle sind keine weiteren Überlegungen nötig: Kerne (Leberkerne, nicht etwa in der Mitte quer getroffene Fibrocyten- oder Muskelzellkerne) welche im Querschnitt rund erscheinen sind als Kugeln aufzufassen und nach Formel a zu berechnen; dies trifft für die Lebern in vivo und für den Grossteil der Mutterstücke zu. Solche Kerne welche birn- oder

wurstförmig (Abb. 5) erscheinen, sind Disci und werden nach Formel b bestimmt; dies sind die Randschleierkerne. Was aber mit Mutterstück-Kernen welche im Schnittbild eine ovale Kontur aufweisen? sind diese kugelähnliche Rotationsellipsoide (Abb. 4) - also nach Formel a bestimmbar - oder sind es durchschnittene Disci - für Formel b ? Die Entscheidung wurde folgendermassen getroffen: lagen diese Kerne mit ihrer Längsachse *nicht* parallel zur Oberfläche der Kultur (Abb. 6 oben), so wurde ihre Form nicht mit der Spannung in der Kultur in Zusammenhang gebracht, sondern durch örtliche Verhältnisse erklärt (auch in Lebern in vivo sieht man ja ovale Kerne), und mittels Formel a berechnet. Lagen diese Kerne aber mit ihrer Längsachse parallel zur Oberfläche der Kultur (Abb. 6 unten), so wurde angenommen, dass es sich um Disci handle und dementsprechend Formel b in Anwendung gebracht.

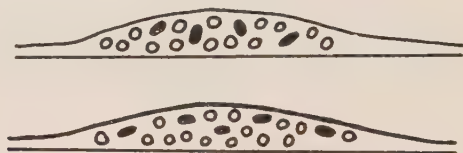


Abb. 6. S. Text.

In diesem Sinne wurde auch das „Kernvolumen“ im Modellversuch bestimmt (Tab. 8).

Die Korrektheit unserer Befunde, die Berechtigung für die Formeln a und b und die Unmöglichkeit das Kernvolumen in der Kultur allein nach der Aufsicht zu bestimmen sind hiermit eindeutig bestätigt. Man beachte die kolossale Flächenzunahme bei der Aufsicht nach Druckausübung. Bei der Berechnung der „Schnitte“ (also der Seitenansichten) bleiben die „Kugeln“ bei Formel b - als Disci - alle in der gleichen Grössenordnung und auch die Schwankungsbreite liegt ungefähr in der Grössenordnung wie sie die „Kerne“ vor der Kompression aufweisen.

Es muss daher für alle zukünftigen Untersuchungen über Kerngrössen in Gewebekulturen gefordert werden, dass dem Verhältnis der Kernradien Rechnung getragen werde und, dass eigentlich jeder einzelne Kern darauf geprüft werden müsste welcher Art Rotationskörper er angehört, das heisst, nach welcher Formel sein Volu-

men zu bestimmen ist; praktisch bedeutet dies also, dass man nach der jeweilig vorherrschenden Kernform berechnen muss.

<i>Vor Abflachung</i>		<i>Nach Abflachung</i>	
Aufsicht Fläche mm ²	'Schnitt' Volumen mm ³	Aufsicht Fläche mm ²	'Schnitt' Volumen mm ³
254	2880	707	2750
255	3050	531	2880
269	2880	363	2830
255	3220	314	2910
255	3050	255	3050
269	3050	284	2850
255	3220	346	3080
269	3050	452	2910
255	3220	661	3040
Schwankungen:			
15	340	452	330

Tab. 8. Modellversuch. 'Optische Querschnitts' — Flächen der Kugeln aus der Aufsicht und Volumen der 'Kerne' aus der Seitenansicht ('Querschnitt') vor und nach Kompression.

D. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Kernvolumen-Bestimmungen der Leberzellen von Hühnchen-, Meerschweinchen- und menschlichen Embryonen bei Züchtung in vitro.

2. Die präparatorische Flächenmessung des optischen Querschnittes der Kerne, wie er in der Aufsicht erscheint, ergibt Flächenhäufungen für bestimmte Zonen des Kulturrandschleiers. Diese Häufungen liegen bei umso grösseren Flächen je weiter peripher im Schleier die Kerne liegen.

Ähnliche Messungen an Oberflächenkulturen zeigen Flächenhäufungen bei grösseren Flächen als es für die entsprechende Schleierzone einer gewöhnlichen Kultur zutrifft.

3. Bei Bestimmung des Kernvolumens an Kulturquerschnitten wird eine neue Berechnungsformel eingeführt:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi R^2 r$$

da die Kerne Disci sind und als solche berechnet werden müssen. Die Messung an den Schnitten deckt eine leichte Kernvolumenzunahme, nach der Kulturperipherie hin, auf. Die Verschiebung der Kerngrössenhäufungen von der Leber in vivo bis zum peripheren Randschleier beträgt eine halbe bis eine ganze Volumenverdoppelung.

4. Es wird angestrebt, exogene und endogene Faktoren der Kernvolumenzunahme zu trennen. Auf Grund der Darlegungen wird wahrscheinlich, dass die Leberzellen in der Gewebekultur von sich aus dieselbe Grösse wie die Zellen in vivo aufweisen würden; die Vergrösserung der Kernvolumina in der Kultur scheint auf exogenen Ursachen (der Kernabflachung) zu beruhen.

5. Ferner wird dargelegt, dass man zu einer richtigen Bestimmung des Kernvolumens in der Gewebekultur nur kommen kann, wenn man den Kulturquerschnitt zusammen mit der Aufsicht berücksichtigt, da aus der Grösse des Kerndurchmessers in der Aufsicht *nicht* auf das Kernvolumen geschlossen werden kann (Tab. 7!). Nur bei Untersuchung des Kulturquerschnittes erkennt man auch die wirkliche Form des zu messenden Kernes und kann dann die entsprechende Berechnungsformel anwenden.

LITERATUR

- ALFERT, M. & BERN, H. A.: Hormonal Influence on Nuclear Synthesis I. Estrogen and Uterine Gland Nuclei. *Proc. Nat. Acad. Science* 37, 202-205, 1951.
- BIRKENMAYER, O.: Vergleichend-anatomische Untersuchungen über die Zellkerngrösse im Wirbeltierstamm. *Z. Anat.* 102, 794-818, 1934.
- BRÜGGER, W.: Funktionsbedingte Unterschiede der Kerngrösse im Schmelzorgan. *Acta Anat.* VII, 345-365, 1949.
- BUCHER, O.: Der Einfluss von Colchizin und Trypaflavin auf den Wachstumsrhythmus und auf die Zellteilung in Fibrocytenkulturen. *Z. Zellf.* 29, 283, 1939. - Über die Wirkung sehr kleiner Colchizindosen. *Schw. med. Wschrft* 715, 1945. - Hemmt oder fördert Colchizin die Zellteilung? *Rev. Suisse de Zool.* 52/25, 535-550, 1945. - Weitere Untersuchungen über die Wirkung von Colchizin auf Gewebekulturen, *Schw. Z. Path. & Bakt.* XI, 6, 643-657, 1946. - Divisions nucléaires amitotiques dans des cultures de Fibrocytes après Administration de Colchicine, *Acta Anat* IV, 60-67, 1948. Zur Methodik karyometrischer Untersuchungen an Gewebekulturen, *Mikroskopie* 5, 124-131, 1950,
- BUCHER, O. & GATTIKER, R.: Karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen II. Die Kerngrössenverhältnisse in der unbehandelten Fibrocytenkultur. *Acta Anat.* 4, 430-460, 1950. - Karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen III. Weitere Untersuchungen über die Kerngrössen in Kulturen von verschiedenen Geweben und von Geweben verschiedener Tiere. *Revue Suisse Zool.* 57, 769-88, 1950.
- BUCHER, O. & HORISBERGER, B.: Karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen I. Zur Methodik der Kerngrössenmessung in Deckglaskulturen. *Acta Anat* 9, 258-278, 1950.
- CLARA, M.: Untersuchungen an der menschlichen Leber II. Teil. Über die Kerngrössen in den Leberzellen. *Z. mikr-anat Forschg.* 22, 145-219, 1930.
- DOGLIOTTI, G. C.: L'indice nucleo plasmatico nelle cellule coltivate „in vitro“. *Arch. Exp. Zellforsch.* 3, 242-249, 1927.
- DOLJANSKI, L.: Sur la morphologie des cultures pures de cellules hépatiques in vitro. *C. r. Soc. Biol. Paris*, 102, 629-631, 1929.
- DÜGGELI, O.: Über den gestaltenden Einfluss von Zugspannungen auf Bindegewebeskulturen. *Z. Zellforsch.* 26, 351-386, 1937.
- FISCHER, A.: Biology of tissue cells, *Copenhagen*, 1946.
- FREERKSEN, E.: Ein neuer Beitrag für das rhythmische Wachstum der Kerne durch vergleichende volumetrische Untersuchungen an den Zellkernen von Meerschweinchen und Kaninchen. *Z. Zellforsch.* 18, 362-399, 1933.
- HELWEG-LARSEN, H. Fr.: Nuclear Class Series. *Munksgaard*, 1952.
- HERBST, C.: Roux' *Archiv* 39, 617-650, 1914. Vererbungsstudien, 10. Die grössere Mutterähnlichkeit der Nachkommen aus Rieseneiern.
- HERTWIG, G.: Parthenogenesis bei Wirbeltieren, hervorgerufen durch artfremden radiumbestrahlten Samen. *Arch. mikr. Anat.* 81, 87-127, 1913.

- HINTZSCHE, E.: Statistische Probleme aus der Kerngrössenforschung. *Experientia* I, 103-110, 1945. - Die Kerngrösse der Follikel-epithelien und der Granulosa-Lutein-Zellen im menschlichen Eierstock. *Mon.schr. f. Geburtsh. & Gyn.* 120, 1945. - Biologische Statistik durch materialgerechte Einteilung. *Schw. Zschr. Volkswirt. & Statistik* 82, 1946. - Zyklische Änderungen der Kerngrösse in Oberflächenepithel und Drüsen des menschlichen Uterus, *Gynaecologia*, 128, 270-285, 1949.
- HINTZSCHE E. & TANNER, E.: Über Beziehungen zwischen Nahrungsaufnahme und Kerngrösse des Darmepithels. *Zschr. mikr. anat. Forschg.* 42, 165-192, 1937.
- JACOB, W.: Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. *Roux' Arch* 106, 124-192, 1925. - Volumetrische Untersuchungen an den Zellkernen des Menschen und das allgemeine Problem der Zellkerngrösse. *Anat Anz* 72, *Erg.H.* 236-247, 1931. - Die verschiedenen Arten des gesetzmässigen Zellwachstums und ihre Beziehung zu Zellfunktion, Umwelt, Krankheit, maligner Geschwulstbildung und innerem Bauplan. *Roux' Arch* 141, 584-692, 1942.
- KELLER, C.: Vergleichende Zellen- und Kernmessungen bei grossen und kleinen Hühnerrassen zur Prüfung der genetisch bedingten Wuchsunterschiede. (Zugleich ein Beitrag zur Frage des rhythmischen Wachstums der Kerne). *Z.Zellf.* 19, 510-536, 1933.
- KRANTZ, H.: Reaktion der Zellkerne auf Narcotica. *Z. f. Naturforsch.* 2b, 428-433, 1947.
- PUFF, A.: Neue morphologische Befunde an der Netzhaut zur Bestätigung der Duplizitätstheorie. *Verhdlg. Anat. Ges. Kiel* 1950. *Anat. Anz.* 97, *Erg.H.* 124-126, 1951.
- SAUSER, G.: Die Grösse des Zellkerns in verschiedenen Tierklassen unter Berücksichtigung des Geschlechtes, der Domestikation und Kastration. *Z. Zellforsch.* 23, 677-700, 1936.
- SIMMENROTH, H.: Untersuchungen über Grössenänderungen der Epithelzellkerne unter verschiedenen Versuchsbedingungen. *Morphol. Jahrb.* 90, 390-406, 1951.
- TEIR, H.: Über Zellteilung und Kernklassenbildung in der glandula orbitalis externa der Ratte. *Acta Pathol. et Microbiol Scand. Suppl.* LVI, 1944.
- WEISS, P.: Erzwingung elementarer Strukturverschiedenheiten am in vitro wachsenden Gewebe. *Roux' Arch* 116, 438-554, 1929.
- WERMEL, E. M. & IGNATJEW, Z. P.: Studien über Zellengrösse und Zellenwachstum. I. Über die Grössenvariabilität der Zellkerne verschiedener Gewebearten. *Z. Zellf.* 16, 674-688, 1932. - Studien über Zellengrösse und Zellenwachstum. II. Über die Veränderung der Zellengrössen bei Gewebeexplantation. *Z. Zellforsch.* 16, 689-706, 1932.
- WERMEL, E. M. & PORTUGALOW, W.W.: Studien über Zellengrösse und Zellenwachstum. XII. Über den Nachweis des rhythmischen Zellenwachstums. *Z. Zellf.* 22, 185-194, 1935.

CURRICULUM VITAE

Am 30.8.1925 wurde ich, Jehudah Leurer, als Sohn des Dr. med. Hans Leurer und seiner Gattin Nelly, geb. Ottensooser, in Nürnberg geboren. Dort besuchte ich drei Volksschulklassen, wanderte im Jahre 1935 in Israel ein und maturierte 1943 in Jerusalem. Nach einem Semester (Biologie) an der Hebräischen Universität, Jerusalem, meldete ich mich im Februar 1944 zum englischen Militär (Field Survey, Royal Engineers), bei welchem ich bis Sommer 1946 in Ägypten und Italien diente. Im Wintersemester 1946/47 begann ich meine Medizinstudien von neuem an der Universität Bern, unterbrach sie jedoch 1948/49 ein Jahr um während des Befreiungskrieges im Israelischen Heer zu dienen (Militärspital „Siv“, Jerusalem; später vorklinischer Wiederholungskurs für Medizinstudenten an diesem Spital) und absolvierte das 2. propädeutische Examen im Frühjahr 1950 in Bern. Zum Wintersemester 1951/52 immatrikulierte ich an der Universität Zürich, woselbst ich im Frühling 1953 die medizinische Doktorprüfung für Ausländer abzulegen hoffe.

